

Helicobacter pylori感染によるDNAメチル化を介した胃分化制御転写因子Sox2の発現抑制機構の解明

著者	越後 紘治
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18491号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00125988

博士論文

Helicobacter pylori 感染による DNA メチル化を介した
胃分化制御転写因子 Sox2 の発現抑制機構の解明

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

内科病態学講座消化器病態学分野

越後 紘治

略語一覽

5-Aza-dc : 5-Aza-2'-deoxycytidine

5mC : C5-methylcytosine

cDNA : complementary DNA

CFU : colony forming units

ChIP : chromatin immunoprecipitation

Ct : threshold cycle

DAB : 3,3'-Diaminobenzidine

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DNMTs : DNA methyltransferases

DTT : Dithiothreitol

FBS : fetal bovine serum

H.pylori : *Helicobacter pylori*

iPS cell : induced pluripotent stem cell

KLF4 : Krüppel-like factor 4

LB : Luria-Bertani

MOI : multiplicity of infection

PBS : phosphate-buffered saline

PCR : polymerase chain reaction

PVDF : Poly Vinylidene Di-Fluoride

qPCR : quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

siRNA : small interference RNA

TAE/EtBr : Tris acetate EDTA/ethidium bromide

TBS-T : Tris-buffered saline with Tween 20

TET : ten-eleven translocation

要約

【背景・目的】 *Helicobacter pylori* (*H.pylori*)感染は、胃粘膜萎縮や腸上皮化生を進展させ胃発癌の原因とされている。転写因子 Sox2 は胃幹細胞の維持と分化を制御し、*H.pylori* 感染で発現が抑制されることが知られている。一方、遺伝子発現のエピジェネティック制御の1つに、DNA methyltransferase (DNMT) 1、3a、3b による DNA メチル化がある。そして、*H.pylori* 感染でも多くの遺伝子が DNA メチル化を受け胃発癌に関与している。Sox2 遺伝子にはプロモーター領域を含め広範囲に DNA メチル化に関わる CpG island が存在している。そこで、*H.pylori* 感染における Sox2 発現抑制機構を、DNA メチル化の観点から解明することを目的とした。

【方法】 ヒト分化型胃癌における Sox2 および DNMTs の発現を免疫組織化学で、さらに TissueFAXS[®]を用い DNMTs 発現量を定量化した。*in vitro* の検討で、ヒト胃癌培養細胞株 MKN45 細胞と GCIY 細胞における Sox2 および DNMTs 発現を Western blot 法と qPCR 法で確認した。さらに両細胞の Sox2 プロモーター領域の CpG island における DNA メチル化状態を Bisulfite sequence 法で比較検討した。また、*H.pylori* を3日間感染させ同様に検討した。加えて、DNA メチル化を受ける CpG island に結合する転写因子を ChIP 法および RNA 干渉法を用いて同定した。

【結果】 免疫組織化学的には、ヒト分化型胃癌 62 例における DNMTs の発現量は、非癌部に比べて癌部においていずれも有意に高かった。また、Sox2 陰性症例 (57 例) で陽性症例 (5 例) より DNMTs の発現は高い傾向にあった。さらに、Sox2 発現を認めない GCIY 細胞では、Sox2 発現を認める MKN45 細胞に比べて、DNMT3a 発現は 4.01 倍と有意に亢進していた。Sox2 プロモーター

上の CpG island -594 位/-496 位における DNA メチル化率は、MKN45 細胞の 4.2%に比較して GCIY 細胞で 56.3%と有意に高かった。GCIY 細胞に対して 5-Aza-dc で DNA 脱メチル化処理すると、Sox2 発現量は 3.49 倍まで回復した。一方、*H.pylori* 感染 MKN45 細胞では、Sox2 発現量は 0.53 倍まで低下し、CpG island -594 位/-496 位における DNA のメチル化率は 4.2%から 18.6%に上昇した。JASPAR 検索で CpG island -594 位/-496 位に結合する転写因子として KLF4 を候補とした。抗 KLF4 抗体および抗 DNMT3a 抗体を用いた ChIP 法より、同部位に KLF4 と DNMT3a の結合が確認できた。また、KLF4 siRNA を用いた RNA 干渉法より、Sox2 発現量は 0.61 倍まで低下した。

【結論】 *H.pylori* 感染によって、ヒト Sox2 プロモーター上の CpG island -594 位/-496 位の DNA メチル化が誘導され、転写因子 KLF4 が同部位に結合することが阻害され、Sox2 発現が抑制されると考えられた。

I. 研究背景

日本における胃癌罹患率は、依然として悪性新生物の中で最も高く¹⁾、世界全体でも5番目に高い²⁾。このため、世界各国で胃癌の遺伝子変異やエピゲノム異常に関する網羅的解析が進んでいる³⁾⁴⁾。一方、グラム陰性桿菌である *Helicobacter pylori* (*H.pylori*)感染は胃発癌の主たる要因の1つであることがよく知られている⁵⁾。*H.pylori*が胃粘膜に感染すると慢性炎症が惹起され、固有胃腺では病理組織学的に、壁細胞と主細胞が減じる胃粘膜萎縮や、杯細胞を伴う腸上皮化生が進展し、そこを発癌母地として分化型胃癌が生ずることが提唱されている (Correa の仮説)⁶⁾。

ホメオボックス遺伝子 Sox2 は、1994 年に同定された分子量 35kDa の転写因子である⁷⁾。発生初期段階では胚性幹細胞の維持や初期分化を担っており、また、induced pluripotent stem (iPS)細胞誘導に必須な遺伝子の1つとして知られている⁸⁾。成体においても Sox2 は、脳、眼球、肺、食道、胃の幹細胞維持と分化に重要な役割を果たしている⁹⁾。胃においては、固有胃腺や幽門腺の幹細胞の位置する増殖帯を中心に発現し、被蓋上皮細胞、主細胞、壁細胞への分化誘導に関わる¹⁰⁾。胃癌においては、Sox2 発現低下と臨床病理学的予後とに相関があるとされている¹¹⁾¹²⁾。分子生物学的には、Sox2 発現低下によって PTEN/Akt¹¹⁾や Wnt/ β -catenin 細胞内シグナル¹³⁾が活性化し、細胞増殖亢進あるいはアポトーシス抑制¹⁴⁾が誘導され、胃発癌に関与することが知られている。また、*H.pylori* 感染によって胃発癌母地となる胃粘膜萎縮や腸上皮化生が進

展する際に、Sox2 発現が抑制されることも報告されている¹²⁾¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。Sox2 の発現が抑制される機序として、Asonuma ら¹⁶⁾は Interleukin-4 による STAT6 細胞内シグナルを介した Sox2 発現誘導経路を *H.pylori* が阻害することを、また、Camilo ら¹⁸⁾は Bone morphogenetic protein 細胞内シグナルが関与していることを報告しているが、未だ不明な点も多い。

エピジェネティック制御は、DNA メチル化やヒストン修飾によって遺伝子の発現を規定することによって、発生・分化や環境への適応で重要な役割を担っている。そして、エピゲノム異常は、がん、自己免疫疾患、代謝性疾患などの病態に深く関与している。DNA メチル化は、DNA の cytosine(C)のピリミジン環の 5 位炭素に、DNA methyltransferases (DNMTs)によって CH₃ 基が付加し、C5-methylcytosine (5mC)に変換することによっておこる。哺乳類においては DNMTs として DNMT1、DNMT3a および DNMT3b が知られている。DNMT1 は DNA 複製の際に DNA メチル化パターンを忠実に継承していき、DNMT3a と DNMT3b は *de novo* 型メチル化活性を担う酵素として、発生・分化や環境への適応に応じて DNA をメチル化していく¹⁹⁾。一般的に DNA 塩基配列上 cytosine(C)の次に guanine (G)が現れる CpG 配列が高頻度で出現する CpG island が DNA メチル化を受け、遺伝子発現が抑制される²⁰⁾。

固有胃腺や幽門腺における幹細胞からの被蓋上皮細胞、壁細胞、主細胞への分化にどのように DNA メチル化が制御しているか明らかとなっていないが、胃癌においては多くの遺伝子が異常な DNA メチル化を受けること²¹⁻²³⁾、さらに *H.pylori* 感染によ

って多くの遺伝子が DNA メチル化され発癌に結びつくことも報告されている²⁴⁻²⁶⁾。

Sox2 は発生・分化に関わる遺伝子として、発生初期段階や iPS 細胞において DNA メチル化や脱メチル化を受け発現が制御されていること²⁷⁻²⁹⁾が明らかとなっている。これらの知見から、*H.pylori* 感染によって胃粘膜萎縮が進展する過程で Sox2 の発現が抑制を受ける際にも、エピジェネティック制御が関与していることが推測される。

II. 研究目的

本研究の目的は、*H.pylori* 感染による Sox2 発現抑制が、胃粘膜萎縮が進展し発癌する過程において、DNMTs 発現とヒト Sox2 プロモーター領域上の CpG island の DNA メチル化によって影響を受けているかどうか、結合する新たな転写因子の同定を含め解明することとした。

Ⅲ. 研究方法

1. 培養細胞株および*H.pylori*の培養

ヒト胃癌培養細胞株AGSはAmerican Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA)、ヒト胃癌培養細胞株GCIYとMKN28は医用細胞資源センター・細胞バンク(東北大学加齢医学研究所, 仙台)、ヒト胃癌培養細胞株KATOIIIとMKN45はJCRB細胞バンク(国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所, 大阪)よりそれぞれ入手した。各種培養細胞は、Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12あるいはRoswell Park Memorial Institute medium1640 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)に10%(v/v)非働化済み仔ウシ血清 (fetal bovine serum; FBS) (Biowest, Logan, UT, USA)と100U/mlペニシリンを加えた培地で、5%CO₂、37℃の条件で培養した。

H.pylori は、*cagA*⁺*H.pylori* ATCC 43504 株を、変法スキロー培地プレート(日本ベクトン・ディッキン、福島)上で 37℃、10% CO₂、5% O₂ の微好気性環境で一晩培養後、10%(v/v)FBS 及び *Helicobacter* selective supplement (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)を添加した Brucella 液体培地 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)に移しさらに一晩培養した。600nm における吸光度を測定し、その値が 1.5 であるときの濃度が 3.6 x10⁵ colony forming units (CFU) /ml であることより ³⁰⁾その濃度を決定した。長期感染実験の場合、multiplicity of infection (MOI)値が 10 になるように調節、つまり、5.0 x10⁵ 個/well の MKN45 細胞に対して、5.0x10⁶ CFU/well の *H.pylori* を 3 日間感染させた。

H.pylori の運動性は、位相差顕微鏡を用い感染前後で確認した。

2. 培養細胞への DNA メチル化阻害剤 5-Aza-2'-deoxycytidine の添加

5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dc) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) を GCIY 細胞に 20 μ M 5-Aza-dc を添加し、24 時間毎に同濃度の 5-Aza-dc を含む培地を交換し 5 日間培養した。陰性コントロールとして、Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) のみ添加し培養した。5 日目に位相差顕微鏡にて、細胞傷害がなくウェル上で 70%以上細胞増殖していることを確認した。

3. 臨床材料

対象症例は、2014 年 2 月から 2015 年 6 月の間に東北大学病院消化器内科で内視鏡的胃粘膜下層剥離術を施行し、病理組織診断で日本胃癌学会胃癌取り扱い規約第 15 版³¹⁾に基づき、高分化型腺癌 (well differentiated type tubular adenocarcinoma:tub1)あるいは中分化型腺癌 (moderately differentiated type tubular adenocarcinoma:tub2)と診断された連続した 62 症例である。*H.pylori* 感染診断は、血清 *H.pylori* 抗体価、尿素呼気試験、内視鏡的萎縮所見³²⁾³³⁾を用い、いずれか 1 つでも陽性所見があれば、*H.pylori* 感染陽性と診断した。本研究は東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の審査・承認 (No.2012-1-473 および No.2017-1-807)を得て行った。

4. 免疫組織化学

10% 中性緩衝ホルマリン液で固定したパラフィン包埋標本を 3 μ m の厚さに薄切し、脱パラフィン後、抗原賦活のために Dako REAL Target Retrieval Solution (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) またはクエン酸緩衝液 (Dako Cytomation)を用いて 120°C で 20 分間オートクレーブ処理した。内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害するため、30 分間 0.3% 過酸化水素加 100% メタノール液に浸し、非特異的反応を阻害するため、1% ヤギ正常血清 (Nichirei, 東京)を加え、室温で 30 分間インキュベーションした。

1 次抗体として、1:80 に希釈した抗 Sox2 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、1:1000 に希釈した抗 DNMT1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、1:1000 に希釈した抗 DNMT3a 抗体 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)、1:500 に希釈した抗 DNMT3b 抗体 (Novus Biologicals)を使用した。それぞれの免疫組織化学に使用した 1 次抗体の詳細は表 1 に示す。組織切片に 1 次抗体を添加し、4°C で 8 時間インキュベーションを行い、0.01M リン酸化緩衝液 (phosphate-buffered saline: PBS) にて 3 回洗浄した。2 次抗体とペルオキシダーゼの複合体であるシンプルステイン MAX-PO (Nichirei)を添加し、室温でさらに 30 分間インキュベーションした。抗原・抗体複合体の可視化は、Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako Cytomation)を用いて 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)発色した。すべての反応の後、切片をヘマトキシリンにて染色した。

Sox2 に対する免疫組織化学の評価は、臨床情報を知らない状態で 2 名の観察者

(H.E, A.I) が独立して行い、腫瘍最大径を表す 1 切片上において、既報に基づき³⁴⁾すべての腫瘍細胞数に対し細胞核が染色されている腫瘍細胞数が 10%以上の症例を陽性症例とした。

DNMTs に対する免疫組織化学の評価は、免疫組織化学後にデジタル画像を撮影し、TissueFAXS[®] (TissueGnostics, Wien, Australia) 細胞解析システムのソフトウェアである HistoQuest ver3.53 で染色強度を定量的に比較検討した。標本切片上の腫瘍部と非腫瘍部の境界に隣接した腫瘍部 3 腺管と非腫瘍部 3 腺管を選択し、上皮細胞以外が認識されないような染色強度と染色面積の cut off 値を設定後、各々の腺管細胞核の平均染色強度を数値化し、さらに非腫瘍腺管に対する腫瘍腺管の染色強度比を算出した。

5. 核酸および蛋白抽出

ゲノム DNA は、各培養細胞から DNAzol Reagent (Invitrogen Life Technologies)を用い、各培養細胞に添加し細胞を溶解後に 100%エタノールで抽出した。同様に Total RNA は、TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies)を各培養細胞に添加し細胞を溶解、クロロホルムを添加し遠心分離後に 100%プロパノールで抽出した。

蛋白は、各培養細胞に細胞溶解液 (0.05M Tris-HCl (pH7.5)), 0.15M NaCl, 1% TritonX-100 (Sigma-Aldrich), proteinase inhibitor cocktail tablet (Complete Mini, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 1% dithiothreitol (DTT)を加えた後、4℃ 1 分間で溶解させ、ホモジネートしたのち 3 回 10 秒間ずつ超音波破碎し、4℃、15000rpm で 30 分間遠心行い

上清を分離し抽出した。分離した蛋白は等量の Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を加えた後、100℃で 5 分間煮沸した。

6. Bisulfite sequence法

各培養細胞から抽出したゲノムDNAを、Epitect® Fast DNA Bisulfite Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて、95℃ 5分、60℃ 10分を2サイクルでBisulfite変換処理を行うことにより、ゲノムDNA中の非メチル化シトシンをウラシルに変換した。このBisulfite変換処理したDNAを鋳型として、*Sox2* プロモーター領域にあるCpG islandを含む領域をpolymerase chain reaction (PCR)法で増幅した。鋳型DNAにはウラシルを多く含むため、PCR酵素はEpitaq HS (タカラバイオ, 滋賀)を用い、nested PCR法で増幅した。このとき、1st round PCRでは、プライマーにhSox2BSa および bを使用し-770位から+71までの841塩基対を増幅し、2nd round PCRでは、hSox2BScおよびdを使用し-751位から-15位までの737塩基対を増幅した。それぞれの増幅に使用したプライマーセットの塩基配列を表2に示す。PCRは98℃ 2分でDNAを変性後、98℃ 10秒、55℃ 30秒、72℃ 1分を40サイクル行った。目的のDNAが増幅しているかをTris acetate EDTA/ethidium bromide (TAE/EtBr)を含んだ1.0%アガロースゲル上で電気泳動し確認、その後、Expresslink T4 DNA Ligase (Invitrogen)を用いプロトコールに従い、この増幅産物をpCR2.1ベクター (Invitrogen)へ挿入し、*E.coli* DH5 α コンピテントセル (タカラバイオ)に形質転換した。その後、Luria-Bertani (LB)寒天培地からそれぞれ30個

の大腸菌コロニーをランダムに選択し、5ml LB培地で8時間培養後Miniprep (QIAGEN) を用いてプラスミドを回収し、TAE/EtBrを含んだ1.0%アガロースゲル上で電気泳動にて目的のプラスミドかどうか確認した。確認されたプラスミドをBigDye Terminator v3.2 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) とシークエンス用プライマーM13Rseq (表2)を用いてDNAを増幅した。スピンカラム (Centri-sep; Princeton, NJ, USA) で精製し、ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems)を用いてsequence解析を行った。解析可能であったDNA塩基配列すべてを対象として、メチル化解析ツールであるQUMA (Quantification tool for Methylation Analysis) (理化学研究, 埼玉) (<http://quma.cdb.riken.jp>) を利用し、DNAメチル化を受けたCpG配列がどの部位に存在するか確認し、DNAメチル化の比率を計測した。

7. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qPCR)法

Total RNA 5 μ g に対して、ランダムヘキサマーを用いて Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies)で first strand cDNA (complementary DNA)を合成した。TaqMan Gene Expression Assays (Invitrogen Life Technologies)を用いて、合成した cDNA に目的とした遺伝子のプライマーと TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)を混合後、Fast 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)に移し、StepOnePlus Real-Time PCR systems (Applied Biosystems)で解析した。PCR は、50 $^{\circ}$ C 2分間、95 $^{\circ}$ C 10分間で変性したのち、95 $^{\circ}$ C 15秒間、60 $^{\circ}$ C 1分間を40サイクルで行っ

た。内在性コントロール遺伝子には β -actin を用いた。遺伝子の発現量は StepOne Software ver2.2 (Applied Biosystems)を用いて threshold cycle (Ct) 値から計算した。具体的にはターゲット遺伝子の Ct 値と β -actin 発現量の Ct 値の差である Δ CT をそれぞれ検出した。そこで、コントロール群の平均 Δ CT をキャリブレーターとしてそれぞれキャリブレーターでの発現量からの差である $\Delta \Delta$ CT を計算し Power 係数($2^{(-\Delta\Delta CT)}$)を用いて平均化処理し比較した。

8. Western blot 法

各々の蛋白50 μ gを10%Mini PROTEAN TGXゲル (Bio-Rad)を用いて、200V、30分間で電気泳動 (SDS-PAGE)し分離した。次に分離した蛋白をPoly Vinylidene Di-Fluoride (PVDF)膜 (Immobilon-P; Millipore)に30V、4℃ 8時間で転写した。非特異的反応を阻害するために、ECL Prime blocking agent (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)を溶解し、0.05% Tween 20 (Bio-Rad)を含むTris-buffered saline with Tween 20 (TBS-T)の中で、PVDF膜を室温にて1時間インキュベーションした。1次抗体として、各々1:1000に希釈した抗Sox2抗体または抗Krüppel-like factor (KLF) 4抗体 (Cell Signaling Technology)、さらに内部コントロールとして1:10000に希釈した抗 β -actinウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology)を用いた。それぞれの1次抗体でPVDF膜を4℃で8時間インキュベーションし、TBS-Tで5回洗浄後、2次抗体として各1:2000に希釈したHRP結合抗ウサギIgG抗体 (Cell Signaling Technology)を添加し、室温で1時間インキ

ュベーションした。化学発光検出のため、ECL Prime (GE Healthcare)を用いて発光させ、ルミノイメージアナライザー (VersaDoc5000; Bio-Rad)にて検出した。

9. クロマチン免疫沈降(ChIP)法

ChIP-IT Express (Active motif, Carlsbad, CA, USA)を用いて、酵素である DNMT3a に対しても既報³⁵⁾があるため、抗 KLF4 抗体および抗 DNMT3a 抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行った。回収した培養細胞を 1% ホルムアルデヒド (Sigma-Aldrich)で固定し酵素切断した後に、一部を input DNA として確保してから、各目的の抗体として、抗 KLF4 抗体、抗 DNMT3a 抗体 (abcam, Cambridge, UK)、または、陰性コントロールとして抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology)に磁気ビーズを加え、4℃ 8 時間、ロータリーシェーカーで混和した。磁気ビーズを 3 回洗浄後、クロマチン(ChIP DNA)を溶出させた。抽出した ChIP DNA、および input DNA を 95℃ 15 分間インキュベーションして DNA と蛋白を解離させた後に Proteinase K を加え、37℃で 1 時間インキュベーションした。以上により得られたクロマチンをテンプレートとして、PCR 法により増幅した。PCR 酵素は PrimeStar GXL (タカラバイオ) を用い touchdown PCR 法で増幅した。プライマーには hSox2ChIP01 および 02 を使用し-724 から-439 までの 286 塩基対を増幅した。プライマーセットの塩基配列は表 2 に示す。PCR は 94℃ 3 分で DNA を変性後、94℃ 30 秒、72℃ 2 分を 5 サイクル、94℃ 30 秒、70℃ 2 分を 5 サイクル、94℃30 秒、68℃2 分を 28 サイクル行った。各 PCR 産物は TAE/EtBr を含

んだ 3.0% アガロースゲル上で電気泳動した。

10. RNA 干渉法

KLF4 遺伝子の small interference RNA (siRNA) (ON-TARGET plus SMART pool) と、陰性コントロールとして Mock siRNA (siCONTROL Non-Targeting siRNA Pool) を Dharmacon (Lafayette, CO, USA) から入手して検討を行った。siRNA (30pmol/μl) を、TransIT-TKO (Mirus Bio, Madison, WI, USA) を用いて、MKN45 細胞に遺伝子導入した。導入 48 時間後、MKN45 細胞より Total RNA を抽出した。

11. 統計処理

免疫染色強度の比較に関しては paired t-test を用い、免疫染色強度比の比較に関する検討では student's t-test を用いた。また、qPCR 法を用いた発現量に関する検討では student's t-test を用い、DNA メチル化に関する検討では、対象同士の各領域に存在するメチル化 CpG 部位数と非メチル化 CpG 部位数を比較した 2 群で 2×2 分割表を作成しカイ二乗検定を用いた。ヒト胃癌組織標本の臨床背景の年齢に関しては mean±standard diviation (SD)、それ以外は mean±standard error (SE) で示した。統計処理には Excel2016 (Microsoft, USA) と “統計 web” (Social Survey Research Information, 東京) (<https://bellcurve.jp>) を使用した。検定を行なったいずれの実験も、独立して少なくとも 5 回施行した。*p* 値が 0.05 未満をもって統計学的に有意であると判定した。

IV. 研究結果

1. ヒト胃癌組織における Sox2 および DNMTs 発現の免疫組織化学

ヒト分化型早期胃癌症例 62 例に対し Sox2 および DNMTs の免疫組織化学的検討を行った。症例背景は 50 歳～87 歳までの平均年齢 73.4 ± 7.6 歳、男性 46 人(74.2%)、女性 16 人(25.8%)、全症例で *H.pylori* 感染陽性だった(表 3)。Sox2 の免疫組織化学的検討では、Sox2 の染色性は、固有胃腺では増殖帯を中心に被蓋上皮細胞、壁細胞、主細胞の核に散在性に、腫瘍腺管でも一部に細胞核に染色性を認めた。(図 1A) 62 例中 57 例 (91.9%)は Sox2 陰性症例で、一方、5 例 (8.1%)が Sox2 陽性症例であった。

DNMTs の免疫組織化学的検討では、上皮細胞、炎症性細胞を問わず、散在性に細胞核に染色強度差を伴い染色性を認めた。そして腫瘍に隣接する萎縮粘膜を主体とした非腫瘍腺管に比べて腫瘍腺管ではびまん性に染色強度が強かった(図 1A)。

TissueFAXS[®]で DNMTs の免疫染色強度を計測し、非腫瘍腺管と腫瘍腺管の染色強度を定量し比較したところ、非腫瘍腺管においては DNMT1 染色強度平均 69.5 ± 4.4 、DNMT3a 染色強度平均 47.1 ± 2.6 、DNMT3b 染色強度平均 49.6 ± 2.5 、一方、腫瘍腺管では DNMT1 染色強度平均 98.9 ± 3.6 、DNMT3a 染色強度平均 67.2 ± 2.8 、DNMT3b 染色強度平均 71.5 ± 3.3 となり、非腫瘍腺管に対し腫瘍腺管で有意に高かった($p < 0.0001$) (図 1B)。Sox2 陰性症例と陽性症例に分けた検討では、Sox2 陰性症例では DNMT1 染

色強度比が平均 1.70 ± 0.11 倍 (95%CI:1.49 - 1.91)、DNMT3a 染色強度比が平均 1.70 ± 0.16 倍(95%CI:1.39 - 2.02)、DNMT3b 染色強度比が平均 1.52 ± 0.07 倍(95%CI:1.39 - 1.65) で非腫瘍腺管に対し腫瘍腺管で高く (図 1C)、一方 Sox2 陽性症例では DNMT1 染色強度比が平均 1.65 ± 0.33 倍(95%CI:1.00 - 2.30)、DNMT3a 染色強度比が平均 1.27 ± 0.11 倍(95%CI:1.06 - 1.49)、DNMT3b 染色強度比が平均 1.46 ± 0.20 倍(95%CI:1.06 - 1.85) であり Sox2 陽性症例においても非腫瘍腺管に対し腫瘍腺管で高い結果となった(図 1C)。Sox2 陰性症例と陽性症例間においては、統計的な有意な差は無かったものの、陰性症例でより非腫瘍腺管に対する腫瘍腺管の DNMTs 染色強度比が高い傾向がみられた。

2. ヒト胃癌培養細胞株における Sox2 および DNMTs 発現

免疫組織化学的検討の結果を踏まえ、5 種類の胃癌培養細胞株(AGS、GCIY、MKN28、MKN45、KATOIII)における蛋白レベルでの Sox2 発現を Western blot 法を用いて検討した。Sox2 は AGS 細胞、MKN45 細胞および KATO III 細胞で発現を認めたが、GCIY 細胞と MKN28 細胞では明らかな発現を認めなかった(図 2A)。

H.pylori 感染実験や RNA 干渉法における遺伝子導入効率を考慮し接着培養細胞が望ましいと考え、接着培養細胞で Sox2 が蛋白レベルで相対的に強く発現していた MKN45 細胞と発現を指摘できなかった GCIY 細胞を用いて Sox2 および DNMTs の

mRNA レベルの発現量を qPCR 法にて定量比較したところ、Sox2 発現量は、GCIY 細胞では MKN45 細胞に対して平均 0.006 ± 0.002 倍と有意に低かった ($p < 0.0001$)。DNMT1 発現量は平均 0.57 ± 0.04 倍 ($p < 0.0001$)、DNMT3b 発現量は平均 0.66 ± 0.06 倍 ($p = 0.006$)であったが、DNMT3a 発現量は平均 4.01 ± 0.34 倍 ($p < 0.0001$)と、GCIY 細胞では MKN45 細胞に対して有意に高かった(図 2B)。

3. Sox2 プロモーター領域の CpG island における DNA メチル化

Sox2 プロモーター領域である-2697 位から-1 位までの塩基配列上の CpG island は、MethPrimer Ver2.0 (<http://www.urogene.org/>)を用いて検索すると、-594 位から-496 位 (-594 位/-496 位) と-172 位から-17 位 (-172 位/-17 位) の 2 領域に存在した(図 3A)。そこでこの 2 領域を含む-751 位から-15 位までの 737 塩基対を増幅し、Bisulfite sequence 法を用いて DNA メチル化率を算出した。-751 位から-15 位全体では 36 ヶ所の CpG 部位が存在し、CpG island である-594 位/-496 位には 5 ヶ所の CpG 部位、-172 位/-17 位には 18 ヶ所の CpG 部位が存在した。-751 位から-15 位までの DNA メチル化率は MKN45 細胞が 2.2% (19/864)に対して GCIY 細胞が 13.0%(126/972)と有意に高かった ($p < 0.0001$)。CpG island 別に DNA メチル化率を検討すると、CpG island -594 位/-496 位の DNA メチル化率は MKN45 細胞が 4.2%(5/120)に対して GCIY 細胞が 56.3%(76/135)と有意に高く ($p < 0.0001$) (図 3B)、CpG island -172 位/-17 位の領域では MKN45 細胞が

0.7%(4/429)、GCIY 細胞が 0.6%(3/483)と両方において DNA メチル化率が非常に低く、またメチル化率に明らかな差はみられなかった($p=0.88$)。以上より CpG island -594 位/-496 位の CpG 部位は、Sox2 が発現している MKN45 細胞より、Sox2 が発現していない GCIY 細胞において有意に DNA メチル化を受けていることが明らかとなった。

4. DNA メチル化阻害剤 5-Aza-2'-deoxycytidine による Sox2 発現回復

CpG island -594 位/-496 位の DNA メチル化率が MKN45 細胞より GCIY 細胞が有意に高かったことを踏まえ、GCIY 細胞に 20 μ M の 5-Aza-dc を 5 日間添加した後、Sox2 の発現を qPCR 法で、DNA メチル化率を Bisulfite sequence 法で比較検討した。Sox2 発現量は 5-Aza-dc 非添加に比べて添加条件下では平均 3.49 ± 0.81 倍と有意な増加がみられた ($p=0.005$) (図 4A)。このため、GCIY 細胞では 5-Aza-dc による脱メチル化によって Sox2 発現量が回復することが示された。

また、Sox2 プロモーター領域 -751 位から-15 位までの DNA メチル化率は、5-Aza-dc 非添加条件下では 13.0%(126/972)であったのに対し、添加条件下では 10.3%(85/826)と低下傾向がみられ、CpG island -594 位/-496 位において DNA メチル化率は 5-Aza-dc 非添加条件下では 56.3%(76/135)に対し、添加条件下では DNA メチル化率は 48.7%(56/115)と統計的に有意な差は見られなかったものの、低い傾向($p=0.23$)を示した(図 4B)。以上より、5-Aza-dc 添加により CpG island -594 位/-496 位は DNA 脱メチル化さ

れ、Sox2 の発現が回復することが推定された。

5. *H.pylori* 感染による Sox2 発現抑制と DNA メチル化

一般的な *H.pylori* 感染は 8 時間で行われているが、可能な限り *in vitro* での長期感染モデルを試み、予備実験を行った結果、至適条件として、MKN45 細胞に対して 5.0×10^6 CFU/ml の *H.pylori* を 3 日間感染させた。非感染細胞をコントロールとして、Sox2 の発現を qPCR 法で、DNA メチル化率を Bisulfite sequence 法にて比較検討を行った。Sox2 発現量はコントロールに対し *H.pylori* 感染下では平均 0.53 ± 0.11 倍と有意な低下 ($p=0.011$) した (図 5A)。Sox2 プロモーター領域 -751 位から -15 位におけるコントロールの DNA メチル化率は 2.2% (19/864)、*H.pylori* 感染条件下の DNA メチル化率は 5.8% (29/503) と、明らかに増加 ($p=0.0006$) した。さらに CpG island -594 位/-496 位の DNA メチル化率は、コントロールでは 4.2% (5/120) に対して *H.pylori* 感染条件下では 18.6% (13/70) と有意に増加した ($p=0.001$) (図 5B)。一方、CpG island -172 位/-17 位の領域では *H.pylori* 非感染では 0.6% (4/429)、*H.pylori* 感染でも 1.5% (4/247) と DNA メチル化率が低く、有意な差はみられなかった ($p=0.26$)。以上より、*H.pylori* 感染によって CpG island -594 位/-496 位の CpG 部位が、比較的特異的に DNA メチル化を受け、Sox2 発現を抑制することが示唆された。

6. Sox2 プロモーター領域上-594 位/-496 位に結合する転写因子の同定

Sox2 プロモーター領域の CpG island -594 位/-496 位の 99 塩基対に対して JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>)を用いて、“Relative profile score threshold 80%” の条件で結合する転写因子と結合する部位を予想したところ、候補として-529 位/-519 位 (CGGGAGCGGC)に転写因子 KLF4 の結合が示唆され(図 6A)、この-529 位/-519 位の塩基配列上には CpG 部位を 2 ヶ所含んでいた(図 6B)。そこで MKN45 細胞および GCIY 細胞における KLF4 発現を確認したところ、蛋白レベルで、MKN45 細胞より GCIY 細胞で発現はやや多いものの、両細胞で発現を確認できた(図 6C)。このため、両細胞の KLF4 の発現量に依存しないで、KLF4 が DNA メチル化によって同部位に結合できないこと²⁰⁾によって Sox2 の発現が低下するという作業仮説を立てた。そこで、20 μ M 5-Aza-dc を 5 日間添加した GCIY 細胞において、5-Aza-dc を添加しない GCIY 細胞を対照として、CpG island -594 位/-496 位に KLF4 が結合するか、抗 KLF4 抗体を用いて ChIP 法で検討した。対照の input DNA および 5-Aza-dc 添加した input DNA ともに同程度の PCR 産物の増幅を認めた。抗 KLF4 抗体で免疫沈降を行った ChIP DNA においては、対照の ChIP DNA では PCR 産物の増幅を認めなかったものの、5-Aza-dc 添加した ChIP DNA では PCR 産物の増幅を認めた。また、抗ウサギ IgG 抗体で免疫沈降を行った陰性コントロールの ChIP DNA では、5-Aza-dc 添加の有無に関わらず PCR 産物の増幅を認めなかった(図 6D)。このため、CpG island -594 位/-496 位が DNA 脱メチル化状態にある場合、転写因子 KLF4 が結合することが示された。

さらに MKN45 細胞に対して KLF4 siRNA を用いて RNA 干渉法で検討した。Mock siRNA を遺伝子導入した MKN45 細胞をコントロールとして、KLF4 および Sox2 発現量を qPCR 法で定量比較したところ、KLF4 の発現量はコントロールに対し平均 0.62 ± 0.03 倍($p=0.0008$)まで抑制されていることを確認でき、Sox2 発現量はコントロールに対し平均 0.61 ± 0.10 倍まで有意に抑制されていた($p=0.027$)(図 6E)。

GCIY 細胞が MKN45 細胞に比較して -594 位/-496 位の DNA メチル化率が高く、かつ、DNMTs の中で DNMT3a 発現のみが亢進していることを踏まえて、CpG island -594 位/-496 位の DNA メチル化に影響を及ぼすのは DNMT3a と推測した。酵素として DNMT3a は標的とした -594 位/-469 部位に結合し DNA メチル化反応を完了すると、同部位から遊離すると考えられる。このため、DNA メチル化率が高い GCIY 細胞では既に DNMT3a が遊離している割合が高いと類推でき、相対的に DNA メチル化率が低い MKN45 細胞の方が DNMT3a の同部位への結合する余地を残しているという作業仮説を立てた。そこで、DNMT3a が同部位に結合可能かどうか ChIP 法で検証するために、MKN45 細胞を用い定性的に同部位への結合能を評価した。input DNA では PCR 産物の増幅を認め、抗 DNMT3a で免疫沈降した ChIP DNA においても PCR 産物の増幅を認めたが、抗ウサギ IgG 抗体免疫沈降を行った陰性コントロールの ChIP DNA では増幅は認めなかった(図 6F)。このため、DNMT3a が CpG island -594 位/-496 位に結合することが示された。

以上より Sox2 プロモーター領域の CpG island -594 位/-496 位には DNA メチル化の

影響を受ける KLF4 結合部位を有し、また、KLF4 は Sox2 発現を直接調節することが示唆された。加えて、CpG island -594 位/-496 位には DNMT3a に結合することも示唆された。

V. 考察

本研究によって、ヒト早期分化型胃癌組織の癌部において DNMTs 発現が亢進していることが明らかとなった。さらにヒト胃癌培養細胞株を用いた検討より、*Sox2* プロモーター領域 -594 位/-496 位に存在する CpG island が *Sox2* 発現制御に関与し、*H.pylori* 感染が同部位の DNA メチル化を誘導することが示された。また、同部位への転写因子 KLF4 の同部位への結合が DNA メチル化で阻害されることが考えられた。(図 7)。

Sox2 はプロモーターや exon 上には多くの CpG island が存在しているが、本研究で対象とした *Sox2* プロモーター -2747 位までの領域には、MethPrimer Ver.2.0 を利用した検索結果で、-594 位/-496 位と-172 位/-17 位の 2 ヶ所に存在していた。今回の Bisulfite Sequencing 解析より、*Sox2* の発現が抑制されている GCIY 細胞において、-172 位/-17 位に存在する CpG 部位 18 個は DNA メチル化を受けていなかったが、-594 位/-496 位に存在する CpG 部位 5 個は 56.3% の DNA メチル化を受けていた。転写開始点から上流 200bp までの CpG island における DNA メチル化は、X 染色体の不活性化で影響を受ける遺伝子や胚細胞のみに特異的に発現する遺伝子など、長期間安定的に発現することを抑制する必要がある場合にのみ起きる反応であるとされている³⁶⁾。*Sox2* の場合には、胚性幹細胞の維持に必須な遺伝子であるのみならず、成体における臓器幹細胞の維持や分化に必要な遺伝子であるために、-172 位/-17 位の CpG island は DNA メチル化を受けていないと考えられた。

Sox2 発現陽性胃癌培養細胞株 MKN45 と Sox2 発現陰性胃癌培養細胞株 GCIY に比較した *in vitro* での検討より、Sox2 プロモーター -594 位/-496 位に存在する CpG 部位の DNA メチル化が Sox2 発現調節制御に重要であることを今回初めて同定した。-594 位/-496 位以外の CpG island として、既に胃癌細胞株 MKN74 や HSC59 においては、exon 上に存在する CpG island の DNA メチル化が、細胞周期停止やアポトーシスを抑制することによって細胞増殖が引き起こされるとされている³⁷⁾。また、肝細胞癌においても、DNMT3a による Sox2 プロモーター 領域-1501 位/-1362 位の CpG island の DNA メチル化により Sox2 発現が制御されている報告³⁸⁾がある。一方、本研究において DNA メチル化阻害剤 5-Aza-dc を添加することによって、-594 位/-496 位の DNA メチル化率は 56.3% から 48.7% に低下したものの、有意差には至らなかったため、Sox2 の発現は、本研究で対象とした-2747 位までの領域以外のプロモーター領域や exon 上の CpG island の DNA メチル化状態の総和に依存し、-594 位/-496 位がその 1 つであると類推された。このため、Sox2 はプロモーターや exon 上の複数の CpG island が選択的に DNA メチル化されることによって、発現は多角的に調整を受けると同時に、DNA メチル化による発癌といった病態に関与していると考えられる。しかしながら、本研究では Sox2 発現陽性細胞として MKN45 細胞、Sox2 発現陰性細胞として GCIY 細胞を代表例として扱い検討を進めた。予備実験の段階で、Sox2 発現陽性細胞である KATOIII 細胞、AGS 細胞、Sox2 発現陰性細胞として MKN28 細胞も検討して、同様の DNA メチル化状態を示したものの、更なる本研究成果の検証のために、*H. pylori*

感染有無別のマウスの正常胃粘膜およびヒト胃粘膜標本を用いて、*Sox2* プロモーター -594 位/-496 位の DNA メチル化状態を今後検討することが望ましいと考えられた。

Sox2 が発現している MKN45 細胞に *H.pylori* を細胞生存可能な範囲で 3 日間と長期に感染させたところ、*Sox2* の発現は有意に抑制され、今回検討した -751 位から -15 位までのプロモーター領域では、特異的に -594 位/-496 位にある CpG 部位が 4.2% から 18.6% まで有意に DNA メチル化を受けていた。このため、*H.pylori* 感染が *Sox2* プロモーター上の -594 位/-496 位にある CpG 部位をメチル化する結果、*Sox2* の発現を抑制することに明らかとなったが、一般的に *H.pylori* 感染以外にも喫煙³⁹⁾やニトロソ化合物⁴⁰⁾が異常 DNA メチル化に関与していることが知られており、実際のヒト胃粘膜においても同部位の DNA メチル化に影響を及ぼすことが考えられる。

今回の検討では発癌初期にある早期胃癌においても、癌組織において DNMTs の発現は非癌組織に比較して発現は亢進しており、発癌過程初期の段階から DNA メチル化が関与していることが推定された。さらに *Sox2* 陰性胃癌症例においては、*Sox2* 陽性胃癌症例に比べて DNMTs の発現亢進は高い傾向を示し、*Sox2* 発現抑制に伴う発癌過程に DNA メチル化が関与していることが類推された。DNMTs の中で DNMT3a の発現は MKN45 細胞に比較して GCIY 細胞で亢進し、さらに ChIP 法を用いた解析より、-594 位/-496 位の CpG 部位に DNMT3a が結合していることが明らかとなり、*Sox2* プロモーター上の -594 位/-496 位の DNA メチル化には DNMT3a が関与することが推定された。ヒト胃癌組織において DNMT3a 発現亢進は、TNM 分類に基づく病期と相

関するとの報告⁴¹⁾がある。*in vitro* による検討でも、細胞周期に関わる Cyclin-dependent kinase 抑制因子 p18^{INK4C} の発現が DNMT3a による DNA メチル化によって抑制され胃癌に関与しているとの報告⁴²⁾や、胃癌の進展・転移に関わる E-cadherin を翻訳する *CDH1* プロモーター領域の DNA メチル化が DNMT3a によっておこなわれているとの報告⁴³⁾があり、このため、DNMT3a は胃癌発癌・進展に関与していることが重要とされている。一方、乳癌細胞や肝細胞癌においても、Sox2 発現が DNMT3a によって抑制されることが³⁸⁾⁴⁴⁾明らかとなっており、DNMT3a は Sox2 プロモーター領域を DNA メチル化することによって、Sox2 発現を抑制し、胃粘膜萎縮や胃癌に寄与することが推定された。しかしながら、今回、免疫組織学を用いた定量的解析からは、Sox2 陰性胃癌では、Sox2 陽性胃癌に比較して、DNMT3a を含めた DNMTs の発現量は増加傾向にあったが有意差を認めなかった。これは、検討した 62 例中 Sox2 陽性胃癌症例が 5 例と極めて少なかったことが有意差を認めなかった一因と考えられるため、今後より多くの Sox2 陽性胃癌症例について検討すべきと思われる。また同時に RNA レベルでの DNMTs の定量など更なる慎重な解析も実施する必要がある。

また、*H.pylori* 感染による DNA メチル化の機序として、MKN45 細胞に比較して Sox2 の発現していない GCIY 細胞で DNMT3a の発現が亢進していたため、*H.pylori* 感染によって DNMT3a の発現が誘導されることを想定したが、*H.pylori* 感染することによって MKN45 細胞では DNMT3a の発現亢進は認められなかった（未発表データ）。

H.pylori 感染によって多くの遺伝子の CpG 部位が DNA メチル化を受けることは事実

であるが、その機序は明らかにはなっていない。ヒトあるいはマウスの *H.pylori* 感染胃粘膜と非感染胃粘膜では、DNMT1、DNMT3a および DNMT3b にいずれにおいても、その発現量に差がないとの報告²⁴⁾⁴⁵⁾もあり、単純に RNA レベルでの DNMTs の発現量だけでは *H.pylori* 感染による DNA メチル化の機序の説明が困難と思われる。*H.pylori* 感染による DNA メチル化には複数の要因が関与しており、*H.pylori* 感染によって ten-eleven translocation (TET) といった DNA 脱メチル化酵素の活性阻害や DNMTs の標的 CpG 部位への結合の促進といった要因も考えられる。

今回同定した -594 位/-496 位には、ChIP 法と RNA 干渉法の検討から、転写因子 KLF4 が結合し、Sox2 の発現に直接関与していることが示唆された。KLF4 は Sox2、c-myc、Oct3/4 と協調して iPS 細胞誘導に必須の遺伝子としてよく知られており、KLF4 が Sox2 の発現を調節しているとの報告⁴⁶⁾もある。しかしながら、Sox2 プロモーター領域のどの部位に KLF4 が転写因子として結合するかは明らかではなかった、今回同定した -594 位/-496 位の CpG は iPS 細胞誘導の際に KLF4 と Sox2 の相互作用に重要な結合部位の候補となると考えられる。一方、KLF4 は成体の多くの臓器でも発現を認め、分化、細胞増殖、細胞相互のヒエラルキーといった臓器のホメオスタシスを維持するために重要な転写因子である⁴⁷⁾。胃においては、細胞増殖を抑制し幹細胞から被蓋上皮細胞への分化を誘導することが知られている⁴⁸⁾。また、臨床病理学的検討から胃癌においては KLF4 の発現は低下し予後と相関するとされ、癌抑制遺伝子的に作用していることも知られている⁴⁹⁾⁵⁰⁾。*in vivo* や *in vitro* の検討で KLF4 の発現を抑制すると、

Wnt/ β -catenin 細胞内シグナルを活性化し細胞増殖を誘導すること⁵¹⁾⁵²⁾や、腸型形質を表す MUC2 が発現することが報告⁵³⁾されている。一方、胃では Sox2 の発現抑制によって、被蓋上皮細胞への分化を示す MUC5ac 発現が抑制され、腸上皮化生を進展させる転写因子 Cdx2 を介して MUC2 が発現誘導することが明らかとなっている¹⁶⁾。このため、本研究で同定した KLF4 が直接 Sox2 を発現調節する経路（KLF4-Sox2 細胞内シグナル経路）によって被蓋上皮細胞への分化が制御されていることが類推できる。そして、固有胃腺や幽門腺において幹細胞から被蓋上皮細胞、壁細胞、主細胞へ分化する過程で、どのように DNA メチル化が分化を制御しているか未だ十分解明されていないが、KLF4-Sox2 細胞内シグナル経路の DNA メチル化は重要な役割を果たしていることが考えられる。さらに、今回新たに同定した-594 位/-496 位の CpG 部位が DNA メチル化されると、KLF4 が Sox2 のプロモーター上の結合部位に結合することが阻害されるため、既知の報告にある KLF4 自体の発現が抑制されることと同様に、Wnt/ β -catenin 細胞内シグナルを活性化し細胞増殖を誘導することも類推される。このため、同部位の異常な DNA メチル化が胃発癌に寄与している可能性もあり、KLF4-Sox2 細胞内シグナル経路を介する胃幹細胞の分化・維持とその異常に関して、エピジェネティック制御も含め、今後、詳細な解析が必要と思われる。

VI. 結論

H.pylori 感染によって引き起こされる CpG island -594/-496 位の DNA メチル化のため、転写因子 KLF4 の DNA への結合が阻害され、これにより Sox2 の発現が抑制されることが推定された。またこの過程に DNMT3a が関与することや、Sox2 発現低下が発癌に関与することが示唆された。

VII. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、病理組織標本の作製に協力いただきました技官 尾柏 キイ子氏、また、Bisulfate sequence 解析において塩基配列決定に支援いただいた東北大学病院共同実験室に感謝いたします。最後に、本研究の立案・実験指導・論文作成に対してご指導いただいた消化器病態学分野 正宗 淳教授、今谷 晃先生、浅野 直喜先生に感謝いたします。

参考文献

1. Center for Cancer Control and Information Services, National Cancer Center [Internet] Cancer Statistics. Tokyo: [cited 2018 Jan 4]
Available from: http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/index.html.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015;136(5):E359-86.
3. Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. Nature. 2014;513(7517):202-9.
4. Padmanabhan N, Ushijima T, Tan P: How to stomach an epigenetic insult: the gastric cancer epigenome. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017;14(8):467-78.
5. Amieva M, Peek RM Jr. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. Gastroenterology. 2016;150(1):64-78.
6. Correa P: Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. Cancer Res 1992;52(24):6735-40.
7. Stevanovic M, Zuffardi O, Collignon J, et al: The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. Mamm Genome 1994;5(10):640-2.
8. Takahashi K, Yamanaka S: A decade of transcription factor-mediated reprogramming to

- pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(3):183-93.
9. Que J, Okubo T, Goldenring JR, et al: Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development.* 2007;134(13):2521-31.
 10. Arnold K, Sarkar A, Yram MA, et al: Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell.* 2011;9(4):317-29.
 11. Zhang X, Yu H, Yang Y, et al: SOX2 in gastric carcinoma, but not Hath1, is related to patients' clinicopathological features and prognosis. *J Gastrointest Surg.* 2010;14(8):1220-6.
 12. Wang S, Tie J, Wang R, et al: SOX2, a predictor of survival in gastric cancer, inhibits cell proliferation and metastasis by regulating PTEN. *Cancer Lett.* 2015;358(2):210-219.
 13. Sarkar A, Huebner AJ, Sulahian R, et al: Sox2 Suppresses Gastric Tumorigenesis in Mice. *Cell Rep.* 2016;16(7):1929-41.
 14. Hütz K, Mejías-Luque R, Farsakova K, et al: The stem cell factor SOX2 regulates the tumorigenic potential in human gastric cancer cells. *Carcinogenesis.* 2014;35(4):942-50.
 15. Tsukamoto T, Inada K, Tanaka H, et al: Down-regulation of a gastric transcription factor, Sox2, and ectopic expression of intestinal homeobox genes, Cdx1 and Cdx2: inverse correlation during progression from gastric/intestinal-mixed to complete intestinal metaplasia. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004;130(3):135-45.

16. Asonuma S, Imatani A, Asano N, et al: *Helicobacter pylori* induces gastric mucosal intestinal metaplasia through the inhibition of interleukin-4-mediated HMG box protein Sox2 expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;297:G312-22.
17. Bornschein J, Tóth K, Selgrad M, et al,: Dysregulation of CDX1, CDX2 and SOX2 in patients with gastric cancer also affects the non-malignant mucosa. *J Clin Pathol* 2013;66(9):819-22.
18. Camilo V, Barros R, Sousa S, et al: *Helicobacter pylori* and the BMP pathway regulate CDX2 and SOX2 expression in gastric cells. *Carcinogenesis*. 2012;33(10):1985-92.
19. Lyko F: The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet*. 2018;19(2):81-92.
20. Li E, Zhang Y: DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(5):a019133.
21. Kim JG, Takeshima H, Niwa T et al: Comprehensive DNA methylation and extensive mutation analyses reveal an association between the CpG island methylator phenotype and oncogenic mutations in gastric cancers. *Cancer Lett*. 2013;330(1):33-40.
22. Shimazu T, Asada K, Charvat H, et al: Association of gastric cancer risk factors with DNA methylation levels in gastric mucosa of healthy Japanese: a cross-sectional study. *Carcinogenesis*. 2015;36(11):1291-8.
23. Higashimori A, Dong Y, Zhang Y et al: Forkhead Box F2 Suppresses Gastric Cancer

- through a Novel FOXF2-IRF2BPL- β -Catenin Signaling Axis. *Cancer Res.* 2018;78(7):1643-56.
24. Nakajima T, Yamashita S, Maekita T, et al: The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter pylori* infection in human gastric mucosae. *Int J Cancer.* 2009;124(4):905-10.
 25. Maeda M, Yamashita S, Shimazu T, et al: Novel epigenetic markers for gastric cancer risk stratification in individuals after *Helicobacter pylori* eradication. *Gastric Cancer.* 2018; s10120-018-0803-4.
 26. Woo HD, Fernandez-Jimenez N, Ghantous A, et al: Genome-wide profiling of normal gastric mucosa identifies *Helicobacter pylori*-and cancer-associated DNA methylome changes. *Int J Cancer.* 2018;143(3):597-609.
 27. Stelzer Y, Shivalila CS, Soldner F, et al: Tracing dynamic changes of DNA methylation at single-cell resolution. *Cell.* 2015;163(1):218-29.
 28. Hu N, Strobl-Mazzulla P, Sauka-Spengler T, et al: DNA methyltransferase3A as a molecular switch mediating the neural tube-to-neural crest fate transition. *Genes Dev.* 2012;26(21):2380-5.
 29. Wu X, Song M, Yang X, et al: Establishment of bovine embryonic stem cells after knockdown of CDX2. *Sci Rep.* 2016;6:28343.
 30. Asano N, Imatani A, Watanabe T, et al: Cdx2 Expression and Intestinal Metaplasia Induced by *H. pylori* Infection of Gastric Cells Is Regulated by NOD1-Mediated Innate Immune

Responses. Cancer Res. 2016;76(5):1135-45.

31. Japanese Gastric Cancer Association: Japanese Classification of Gastric Carcinoma (October 2017 [The 15th Edition])
32. Mihara M, Haruma K, Kamada T, et al: The role of endoscopic findings for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: evaluation in a country with high prevalence of atrophic gastritis. Helicobacter. 1999; 4(1):40-8.
33. Asaka M, Sugiyama T, Nobuta A, et al: Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in Japan: results of a large multicenter study. Helicobacter. 2001;6(4):294-9.
34. Tsukamoto T, Mizoshita T, Mihara M, et al: Sox2 expression in human stomach adenocarcinomas with gastric and gastric-and-intestinal-mixed phenotypes. Histopathology. 2005;46(6):649-58.
35. Jin B, Ernst J, Tiedemann RL, et al: Linking DNA methyltransferases to epigenetic marks and nucleosome structure genome-wide in human tumor cells. Cell Rep. 2012 29;2(5):1411-24.
36. Jones PA: Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. Nat Rev Genet. 2012;13(7):484-92.
37. Otsubo T, Akiyama Y, Yanagihara K, et al: SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. Br J Cancer. 2008;98(4):824-31.

38. Liu L, Liu C, Zhang Q, et al: SIRT1-mediated transcriptional regulation of SOX2 is important for self-renewal of liver cancer stem cells. *Hepatology*. 2016;64(3):814-27.
39. Abbaszadegan MR, Moaven O, Sima HR, et al: p16 promoter hypermethylation: a useful serum marker for early detection of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2008 7;14(13):2055-60.
40. Niwa T, Yamashita S, Tsukamoto T, et al: Whole-genome analyses of loss of heterozygosity and methylation analysis of four tumor-suppressor genes in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat stomach carcinomas. *Cancer Sci*. 2005;96(7):409-13.
41. Yang J, Wei X, Wu Q, et al: Clinical significance of the expression of DNA methyltransferase proteins in gastric cancer. *Mol Med Rep*. 2011;4(6):1139-43.
42. Cui H, Zhao C, Gong P, et al: DNA methyltransferase 3A promotes cell proliferation by silencing CDK inhibitor p18^{INK4C} in gastric carcinogenesis. *Sci Rep*. 2015;5:13781.
43. Cui H, Wang L, Gong P, et al: Deregulation between miR-29b/c and DNMT3A is associated with epigenetic silencing of the CDH1 gene, affecting cell migration and invasion in gastric cancer. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123926.
44. Stolzenburg S, Beltran AS, Swift-Scanlan T, et al: Stable oncogenic silencing *in vivo* by programmable and targeted *de novo* DNA methylation in breast cancer. *Oncogene*. 2015;34(43):5427-35.
45. Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, et al: Inflammatory processes triggered by *Helicobacter*

- pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res.* 2010;70(4):1430-40.
46. Kim J, Chu J, Shen X, et al: An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell.* 2008;132(6):1049-61.
 47. Ghaleb AM, Yang VW: Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene.* 2017;611:27-37.
 48. Kim CK, He P, Bialkowska AB, et al: SP and KLF Transcription Factors in Digestive Physiology and Diseases. *Gastroenterology.* 2017;152(8):1845-75.
 49. Wei D, Gong W, Kanai M, et al: Drastic down-regulation of Krüppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer Res.* 2005;65(7):2746-54.
 50. Hashimoto I, Nagata T, Sekine S, et al: Prognostic significance of KLF4 expression in gastric cancer. *Oncol Lett.* 2017;13(2):819-26.
 51. Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, et al: Loss of Klf4 in mice causes altered proliferation and differentiation and precancerous changes in the adult stomach. *Gastroenterology.* 2005;128(4):935-45.
 52. Zhang N, Zhang J, Shuai L, et al: Krüppel-like factor 4 negatively regulates β -catenin expression and inhibits the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer. *Int J Oncol.* 2012;40(6):2038-48.

53. Yu T, Chen X, Lin T, et al: KLF4 deletion alters gastric cell lineage and induces MUC2 expression. *Cell Death Dis.* 2016;7(6):e2255.

図の説明

図 1. ヒト胃癌組織における Sox2 および DNMTs 発現の免疫組織化学

(A) ヒト胃癌組織における Sox2 および DNMTs の免疫組織化学。上から：HE 染色像、Sox2 免疫染色像、DNMT1 免疫染色像、DNMT3a 免疫染色像、DNMT3b 免疫染色像、左側：Sox2 陰性症例、右側：Sox2 陽性症例。Sox2 は正常固有胃腺では増殖帯を中心に被蓋上皮細胞、壁細胞、主細胞の核に散在性に、Sox2 陽性症例では腫瘍腺管の細胞核にも染色性を認め 62 例中 57 例 (91.9%) は Sox2 陰性症例で、5 例 (8.1%) が Sox2 陽性症例であった。DNMTs はいずれも上皮細胞や炎症性細胞に、散在性に細胞核に染色性を認め、非腫瘍腺管に比べて腫瘍腺管で染色強度が強かった。(100 倍視野、bar は 100 μ m を示す) (B) TissueFAXS[®]を用いた、隣接した非腫瘍腺管と腫瘍腺管の DNMTs 免疫染色強度の定量比較。左より：DNMT1 染色強度、DNMT3a 染色強度、DNMT3b 染色強度。全ての DNMTs 染色強度において非腫瘍腺管に対し腫瘍腺管で有意に高かった。(C) TissueFAXS[®]を用いた DNMTs 免疫染色強度に基づく、非腫瘍腺管に対する腫瘍腺管の DNMTs 発現量比。左より：DNMT1 染色強度比、DNMT3a 染色強度比、DNMT3b 染色強度比。Sox2 陰性症例、陽性症例とも非腫瘍部に対し腫瘍部での DNMTs 発現亢進が確認できるが、Sox2 陰性症例は陽性症例と比較しより非腫瘍部に対する腫瘍部の DNMTs 発現が亢進する傾向を認めた。

図 2. ヒト胃癌培養細胞株における Sox2 および DNMTs 発現

(A) ヒト胃癌培養細胞における蛋白レベルでの Sox2 発現。左より : AGS 細胞、GCIY 細胞、MKN28 細胞、MKN45 細胞、KATOIII 細胞における Sox2 の発現。AGS 細胞・MKN45 細胞・KATOIII 細胞で Sox2 発現がみられ、GCIY 細胞・MKN28 細胞では発現が確認されなかった。(B)MKN45 細胞および GCIY 細胞における mRNA レベルでの Sox2 発現の定量比較。mRNA レベルにおいて MKN45 細胞に対し GCIY 細胞で平均 0.006 倍と Sox2 発現が有意に低下していた。(C) MKN45 細胞および GCIY 細胞における mRNA レベルでの DNMTs 発現。左から : DNMT1 発現量、DNMT3a 発現量、DNMT3b 発現量。Sox2 発現が陽性である MKN45 細胞に対して Sox2 発現陰性である GCIY 細胞において平均 4.01 倍と DNMT3a の有意な発現亢進を認めた。

図 3. Sox2 プロモーター領域の CpG island における DNA メチル化

(A) MethPrimer Ver2.0 で検索したヒト Sox2 プロモーター領域の CpG island。CpG island は-594 位/-496 位と-172/-17 位の 2 領域存在した。(B)MKN45 細胞および GCIY 細胞における Sox2 プロモーター 領域の DNA メチル化率。上段が MKN45 細胞、下段が GCIY 細胞の DNA メチル化状態。代表的な Bisulfite sequence で塩基配列同定後 DNA メチル化状態に変換した模式図を 1 線上に示す。白丸は非メチル化の CpG 部位、黒丸はメチル化の CpG 部位を示す。棒グラフは各々の CpG 部位の DNA メチル化率を

示す。Sox2 陽性である MKN45 細胞では-594 位/-496 位における DNA メチル化率が 4.2%なのに対し Sox2 陰性である GCIY 細胞では同部位のメチル化率は 56.3%と有意なメチル化の亢進を認めた。

図 4. DNA 脱メチル化剤 5-Aza-dc 添加による Sox2 発現と DNA メチル化率

(A) 20 μ M 5-Aza-dc を GCIY 細胞に 5 日間添加した 5-Aza-dc 添加群と非添加群の mRNA レベルでの Sox2 発現量の比較。メチル化阻害剤である 5-Aza-dc を添加することにより平均 3.49 倍と Sox2 発現量は有意な増加を認めた。(B) 5-Aza-dc 添加群と非添加群の-594/-496 位の DNA メチル化率の比較検討。-594/-496 位には 5 か所の CpG 部位があり、下図の棒グラフがそれぞれの CpG 部位の DNA メチル化率を表している。5-Aza-dc を添加することにより-594/-496 位のメチル化が阻害される傾向を認めた。

図 5. *H.pylori* 感染における Sox2 発現と DNA メチル化率

(A) 5.0x10⁶CFU/ml の *H.pylori* を MKN45 細胞に 3 日間感染させた *H.pylori* 感染群と非感染群の mRNA レベルでの Sox2 発現量の比較。感染群において平均 0.53 倍と Sox2 発現量は有意な低下を認めた。(B) *H.pylori* 感染群と非感染群の-594/-496 位の DNA メチル化率の比較検討。感染群において-594/-496 位の DNA メチル化は有意な亢進を認めた。

図 6. *Sox2* プロモーター領域 -594 位/-496 位に結合する転写因子の同定

(A)*Sox2* プロモーター領域の-594 位/-496 位に対して JASPAR (Relative profile score threshold 80%)で検索し得られた KLF4 結合予測配列。-529 位/-519 位に結合予測部位を認めた。(B) CpG island -594 位/-496 位を含む *Sox2* プロモーター領域の塩基配列。KLF4 結合予測部位の-529 位/-519 位には 2 か所の CpG 部位を含む。(C)MKN45 細胞および GCIY 細胞で KLF4 の蛋白レベルでの発現。*Sox2* 陽性である MKN45 細胞、陰性である GCIY 細胞ともに KLF4 の発現を認めた。(D)ChIP 法を用いた -594 位/-496 位への DNA 脱メチル化状態での KLF4 の結合。左から：input DNA、抗 KLF4 抗体を用いた ChIP DNA、抗ウサギ IgG を用いた陰性コントロールの ChIP DNA。各々 5-Aza-dc 添加と 5-Aza-dc 無添加（対照）別に示す。5-Aza-dc 添加時の抗 KLF4 抗体を用いた ChIP DNA で増幅を認めた。(E) KLF4 siRNA による *Sox2* 発現量の変動。左から：KLF4 発現量、*Sox2* 発現量。KLF4 siRNA により KLF4 発現を knockdown すると平均 0.61 倍と *Sox2* 発現量が有意に低下した。(F) ChIP 法を用いた -594/-496 位への DNMT3a の結合。左から：input DNA、抗 DNMT3a 抗体を用いた ChIP DNA、抗ウサギ IgG を用いた陰性コントロールの ChIP DNA。-594/-496 位への DNMT3a の結合を認めた。

図 7. 本研究のまとめ

表 1

抗体名	製造元	希釈倍率	抗原賦活化
抗Sox2抗体	Cell Signaling Technology	80倍	Dako REAL Target Retrieval Solution
抗DNMT1抗体	Santa Cruz Biotechnology	1000倍	クエイン酸緩衝液
抗DNMT3a抗体	Novus Biologicals	1000倍	クエイン酸緩衝液
抗DNMT3b抗体	Novus Biologicals	500倍	クエイン酸緩衝液

表 2

Primer 名	Primer 塩基配列
hSox2BSa	5'-AATTAAATAAACCAACCATCCATATAAC-3'
hSox2BSb	5'-GTTAAAGAGTTGAGTTGGATAGGGAG-3'
hSox2BSc	5'-ATCAAAAAATAAATAATTCTAAC-3'
hSox2BSd	5'-TAGGGAGATGGTAGTTATTAAAGG-3'
M13Rseq	5'-CAGGAACAACGCTATGAC-3'
hSox2ChIP01	5'-CTGGTTCTCAGCTCTAGAGTCTGCC-3'
hSox2ChIP02	5'-GAAACACGCCAGTGCAAGGAGTTGGTG-3'

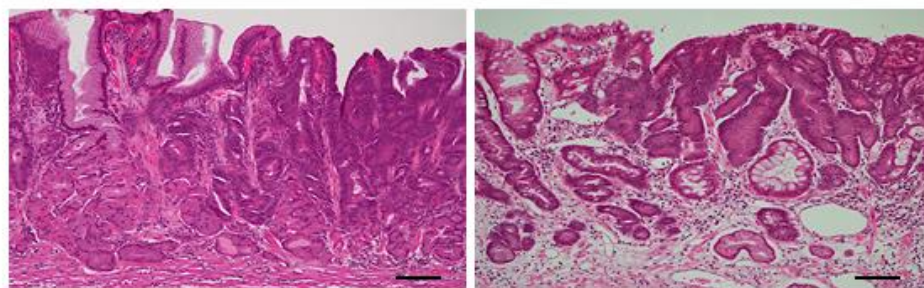
表 3

	All (n=62)	Sox2 negative (n=57)	Sox2 positive (n=5)
年齡 (years)	73.4 ± 7.6 (50-87)	73.6 ± 7.2 (50-87)	75.2 ± 6.4 (69-84)
性別 (n,%)			
男性	46 (74.2%)	45 (78.9%)	1 (20.0%)
女性	16 (25.8%)	12 (21.1%)	4 (80.0%)
肉眼型 (n,%)			
I	2 (3.2%)	2 (3.5%)	0 (0.0%)
IIa	22 (35.5%)	22 (38.6%)	0 (0.0%)
IIb	1 (1.6%)	1 (1.8%)	0 (0.0%)
IIc	37 (59.6%)	32 (56.1%)	5 (100%)
III	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
組織型 (n,%)			
tub1	53 (85.5%)	51 (89.5%)	2 (40.0%)
tub2	9 (14.5%)	6 (10.5%)	3 (60.0%)
局在 (n,%)			
上部	10 (16.1%)	9 (15.8%)	1 (20.0%)
中部	18 (29.0%)	17 (29.8%)	1 (20.0%)
下部	34 (54.8%)	31 (54.4%)	3 (60.0%)
<i>H.pylori</i> 感染 (n,%)			
陰性	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
陽性	62 (100%)	57 (100%)	5 (100%)

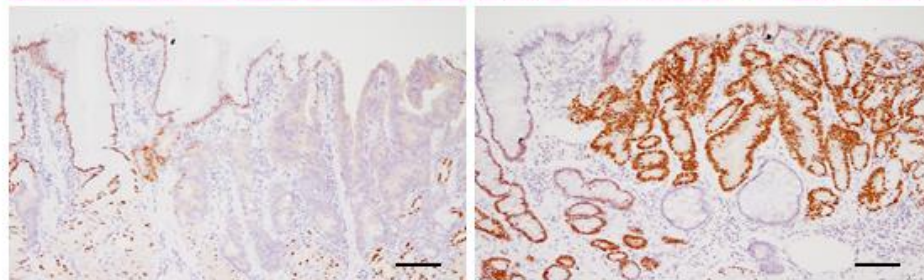
图 1

A.

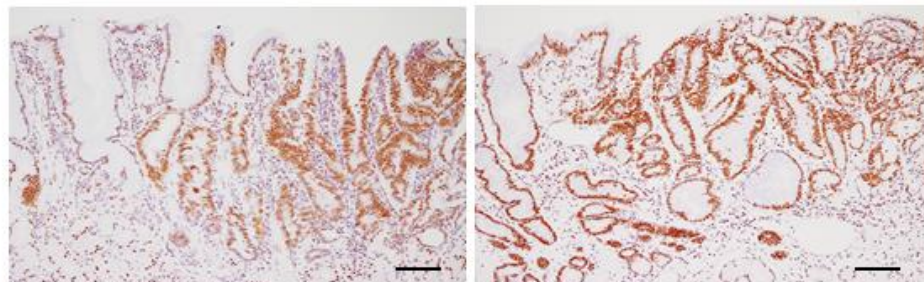
HE



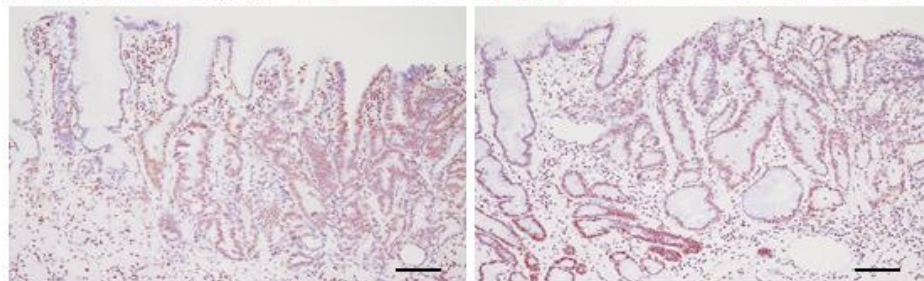
Sox2



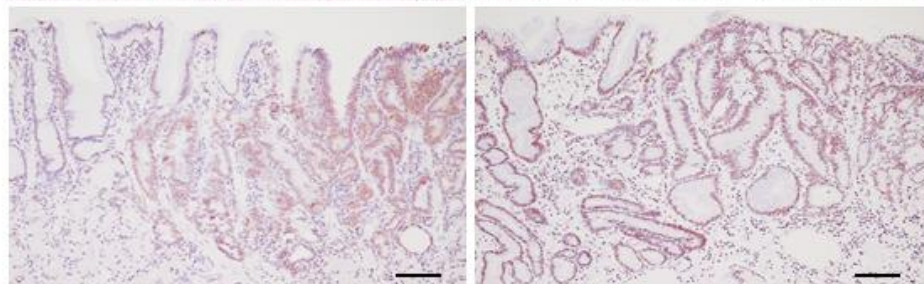
DNMT1



DNMT3a



DNMT3b



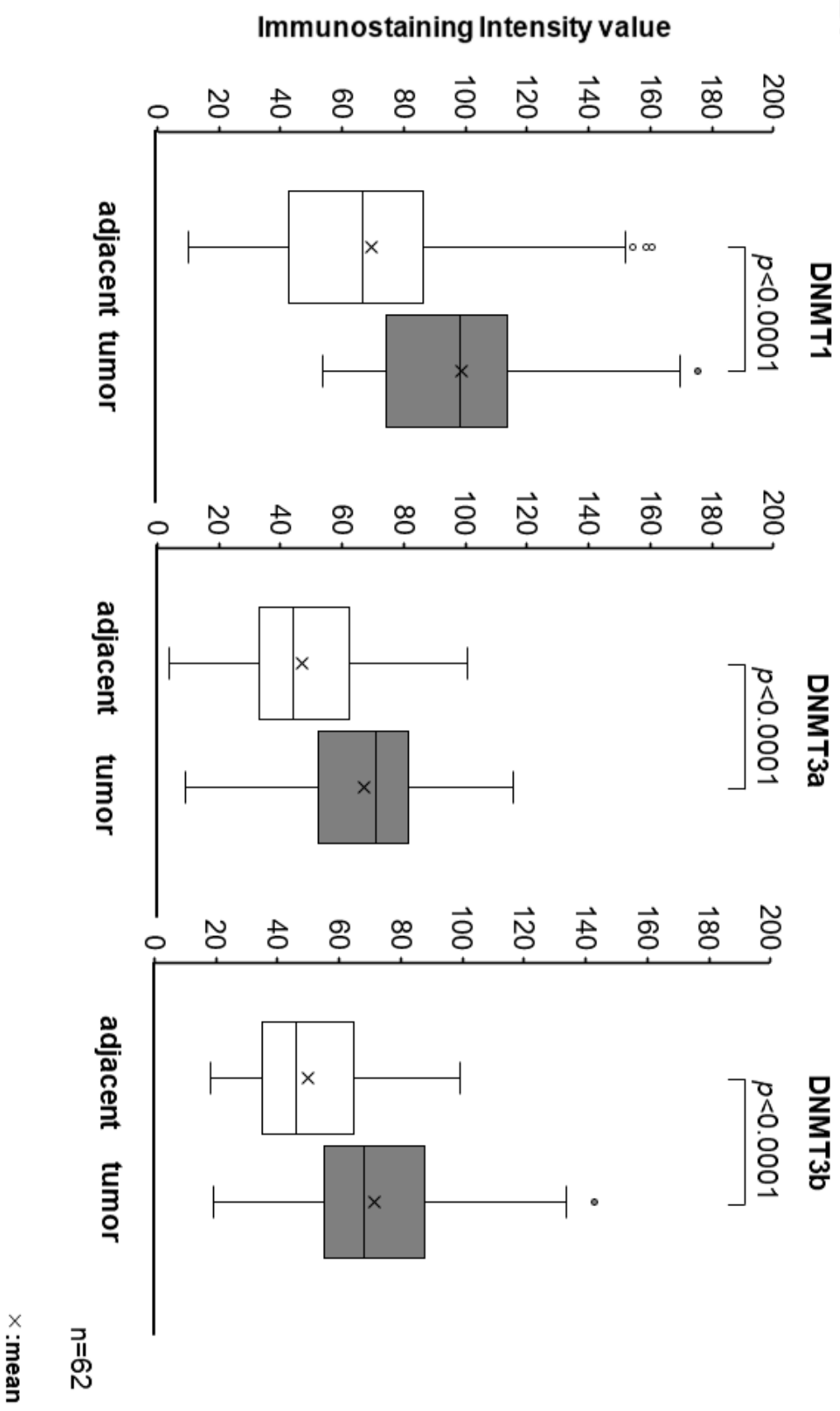
Sox2 negative
57/62 cases
(91.9%)

Sox2 positive
5/62 cases
(8.1%)

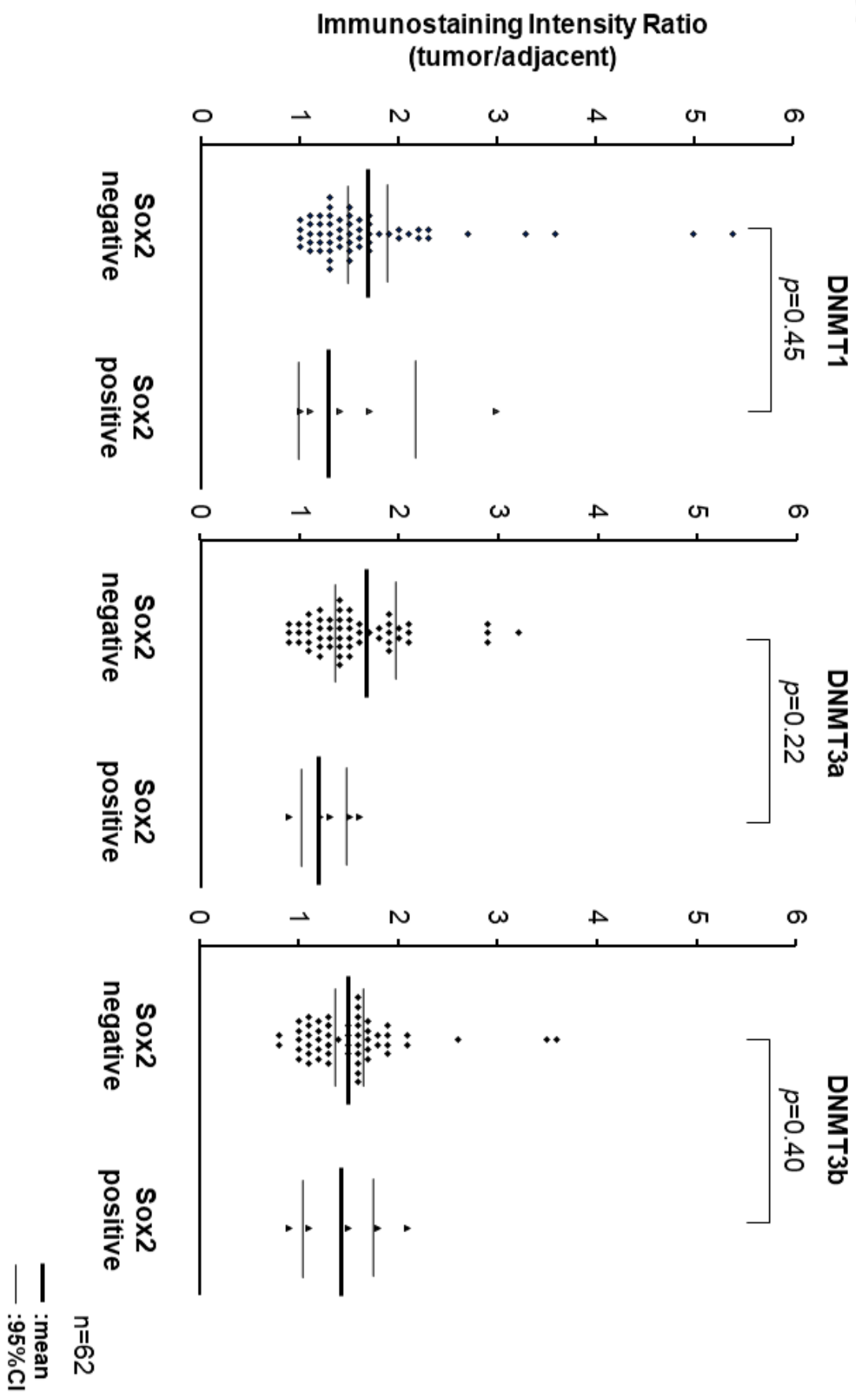
— :100μm

1

B.

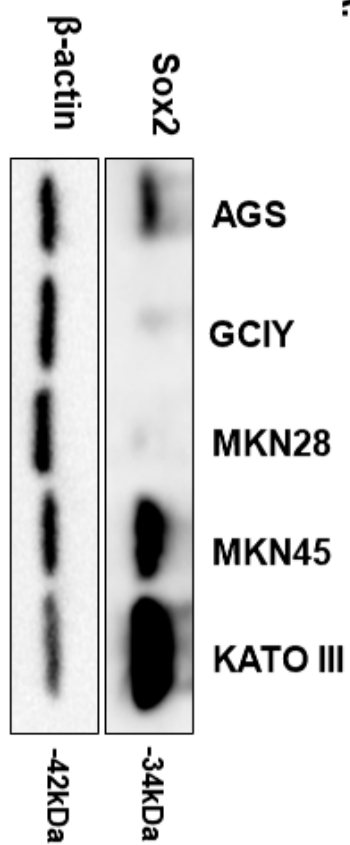


C.



2

A.



B.



C.

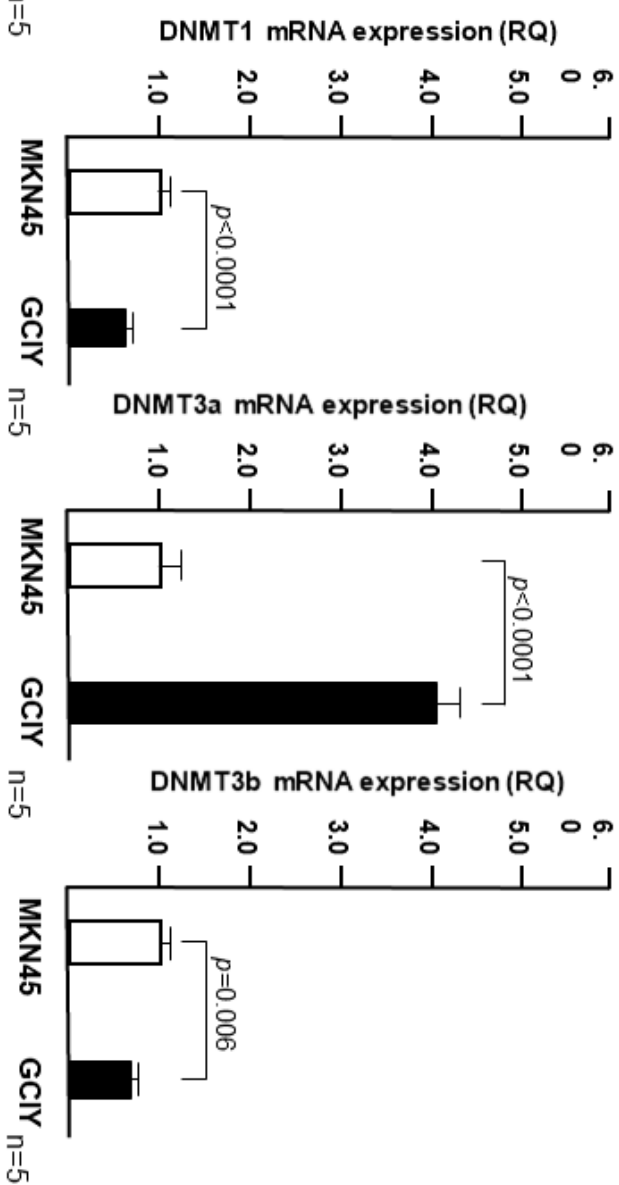
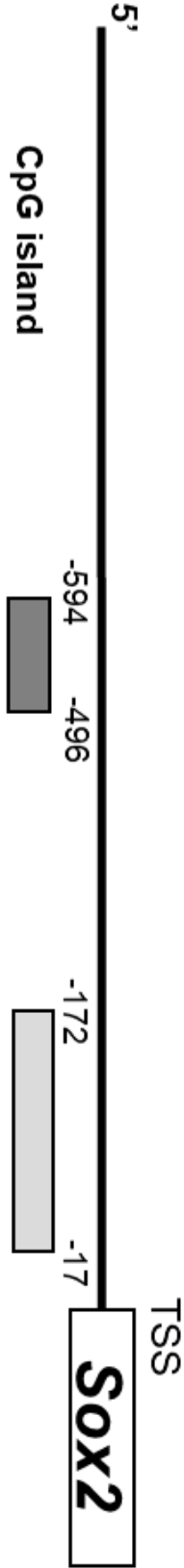
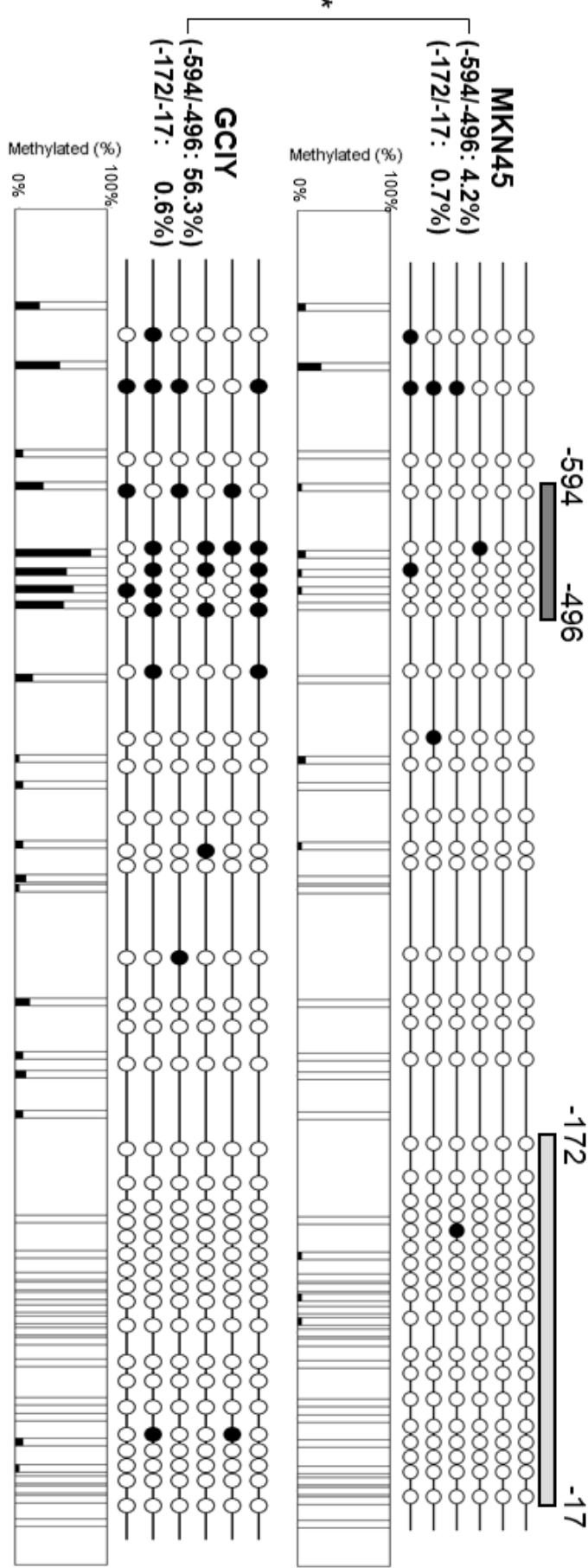


图 3

A.



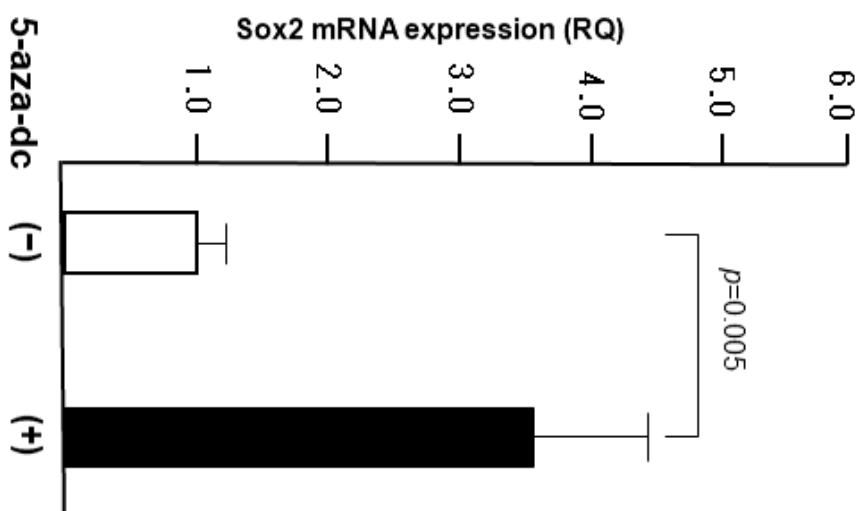
B.



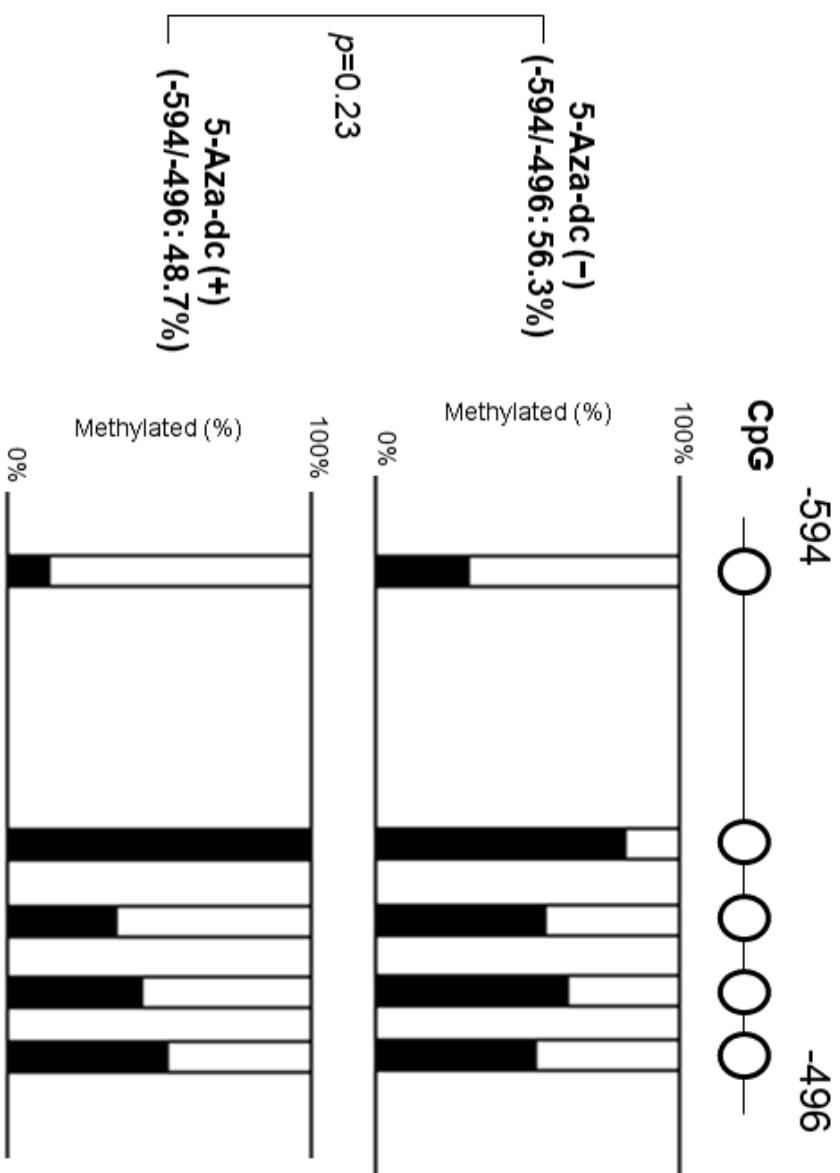
*: $p < 0.0001$

Figure 4

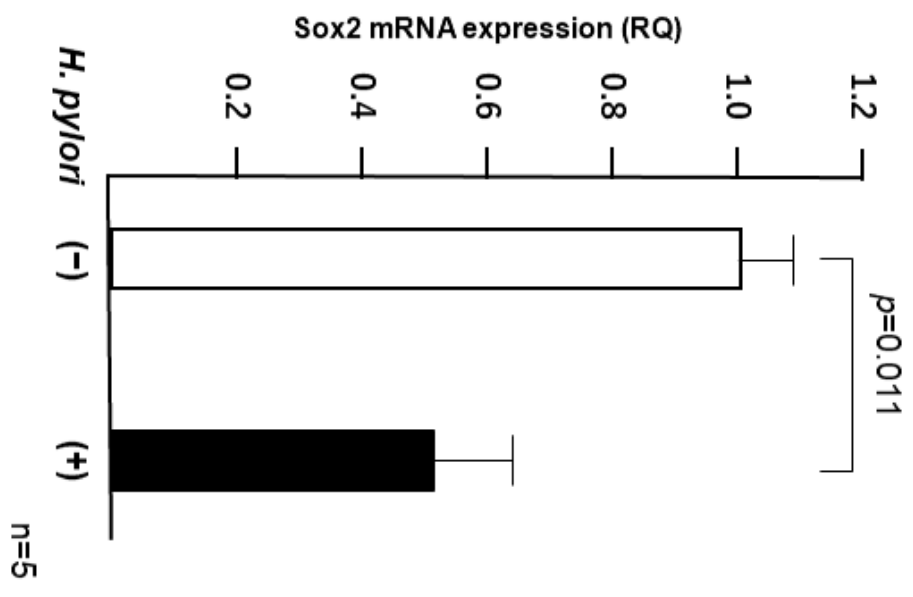
A.



B.



A.



B.

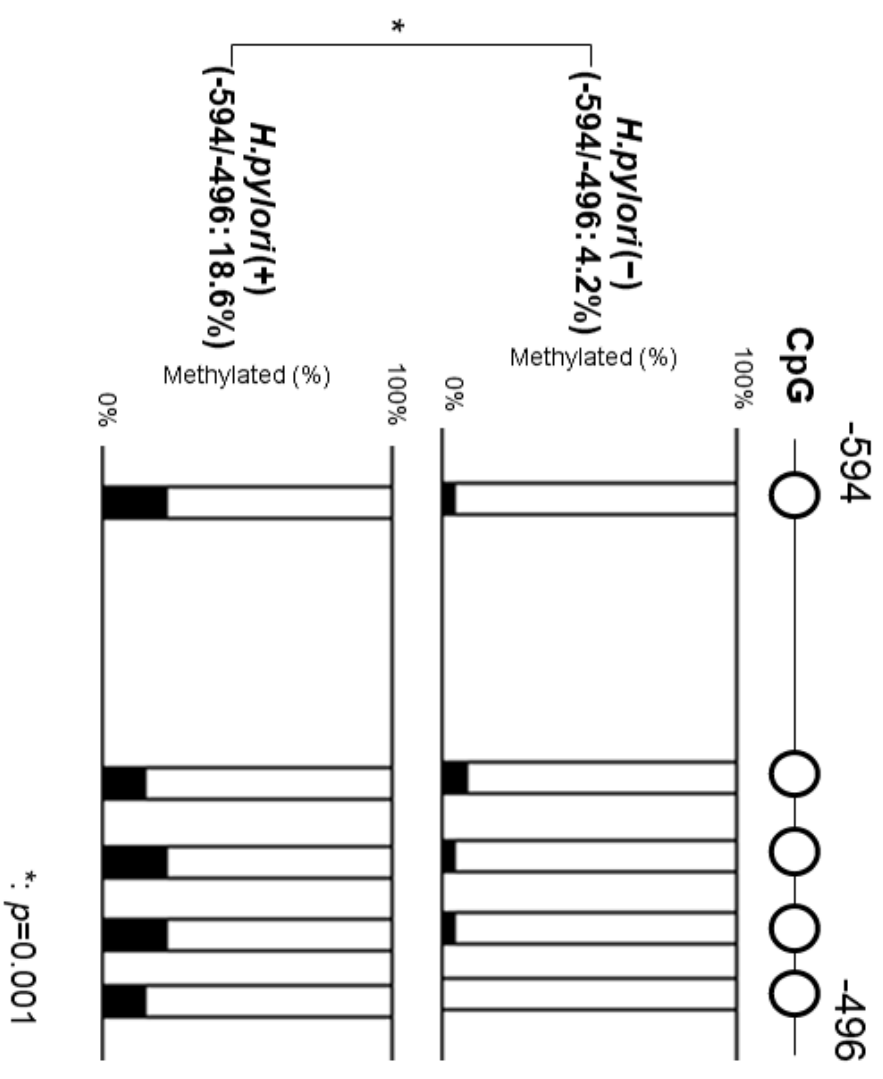
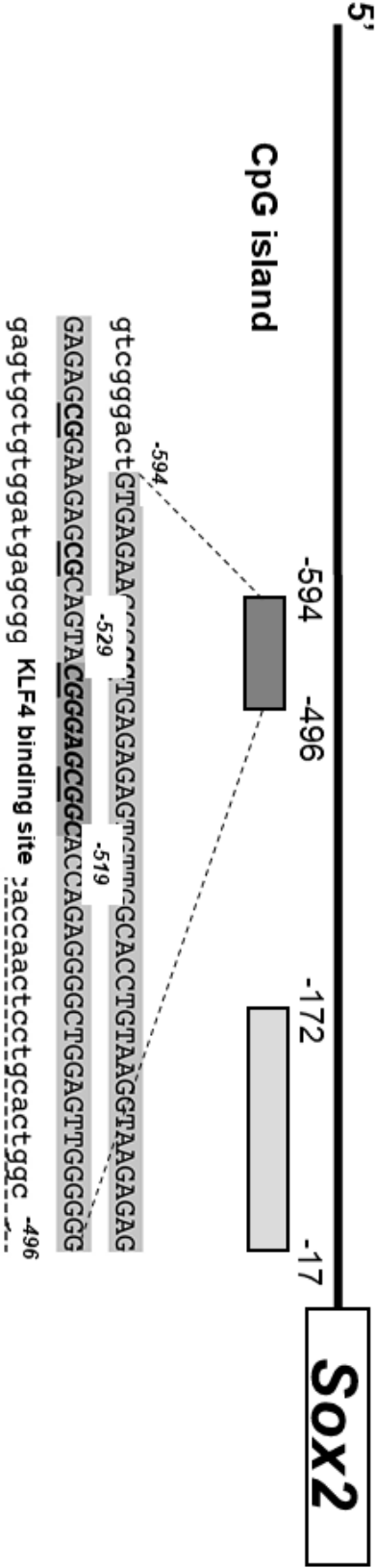


図 6

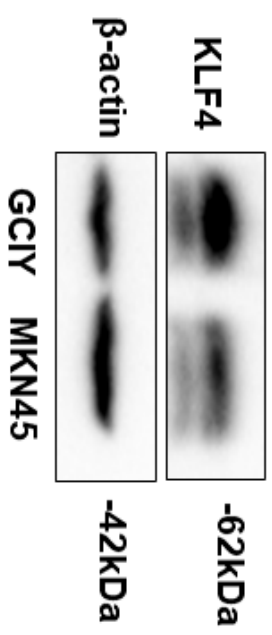
A.



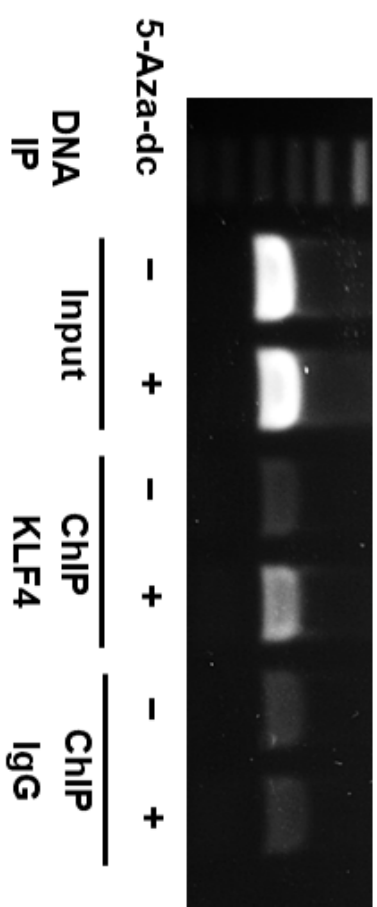
B.



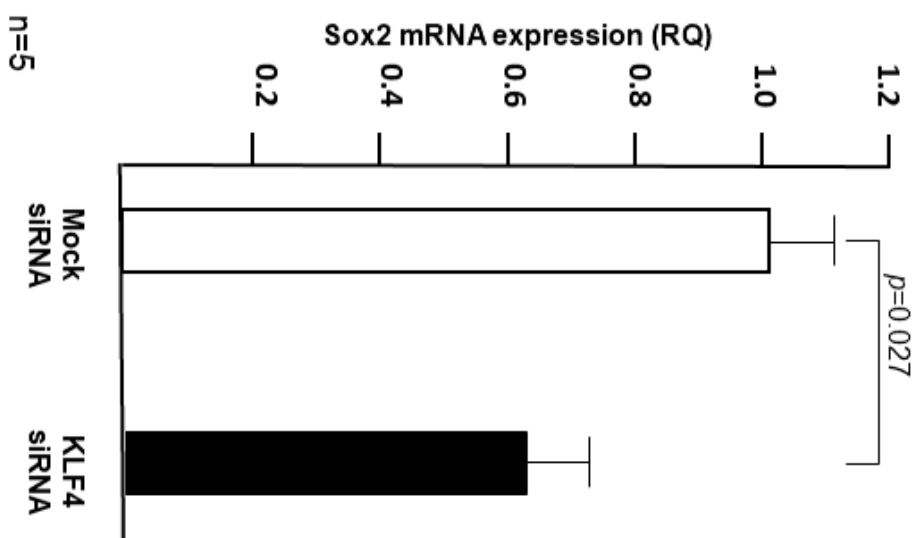
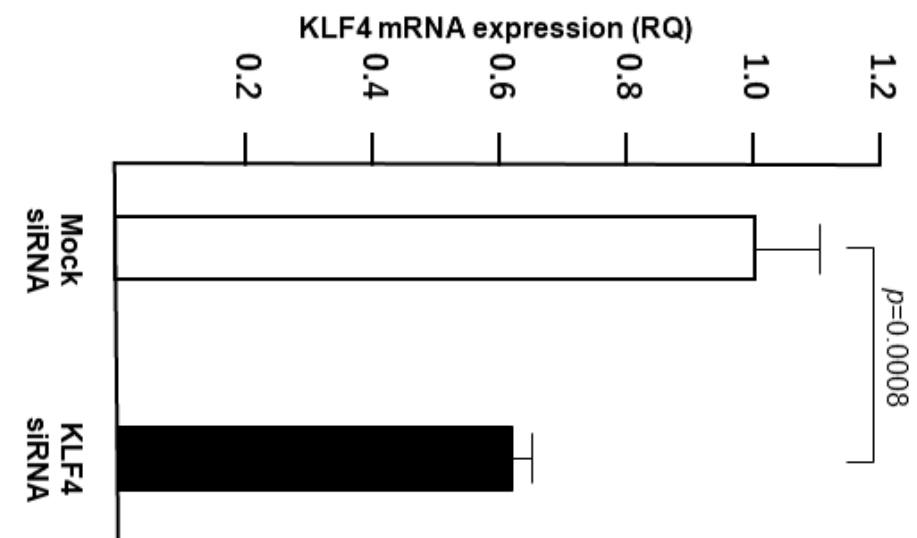
C.



D.



E.



F.

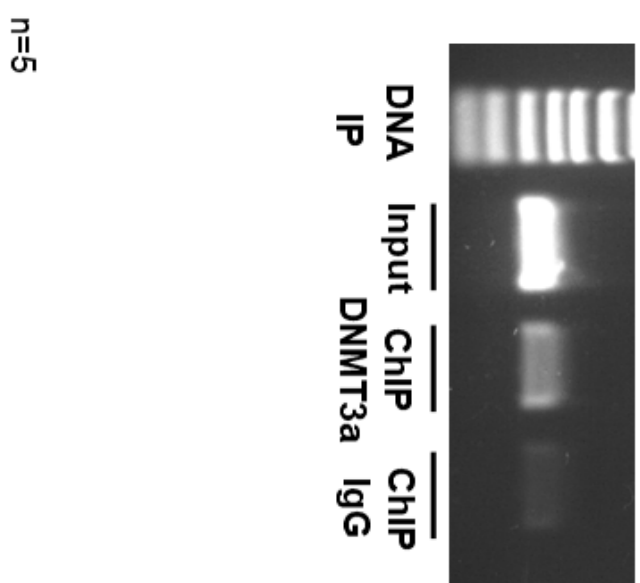


图 7

本研究の知見

